

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Off nlegungsschrift
10 DE 195 33 682 A 1

51 Int. Cl.⁶:
A 61 L 27/00
B 05 D 5/00
A 61 F 2/06
A 61 F 2/24
C 07 K 17/14

21 Aktenzeichen: 195 33 682.8
22 Anmeldetag: 12. 9. 95
43 Offenlegungstag: 13. 3. 97

DE 195 33 682 A 1

71 Anmelder:
BIOTRONIK Meß- und Therapiegeräte GmbH & Co.
Ingenieurbüro Berlin, 12359 Berlin, DE

74 Vertreter:
Patentanwälte Rau, Schneck & Hübner, 90402
Nürnberg

72 Erfinder:
Amon, Michael, 90556 Cadolzburg, DE; Bolz, Armin,
Dr., 91058 Erlangen, DE; Müssig, Dirk, 90439
Nürnberg, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE	28 31 360 C2
DE	43 36 209 A1
US	51 82 317
US	50 02 582
US	49 23 465
EP	05 28 039 A1

EP 0761244

54 Verfahren zum Anlagern und Immobilisieren von Heparin auf anorganischen Substratoberflächen von kardiovaskulären Implantanten

57 Ein Verfahren zum Anlagern und Immobilisieren von Heparin auf anorganischen Substratoberflächen von kardiovaskulären Implantaten weist folgende Verfahrensschritte auf:

- Aktivierung der anorganischen Substratoberfläche durch Anätzen,
- Anlagern einer photoaktiven Benzophenonverbindung unter UV-Bestrahlung als Spacer mit einer Aminoschutzgruppe auf der aktivierten Substratoberfläche,
- Abspaltung der Aminoschutzgruppe mit einer wasserfreien Piperidinlösung, und
- kovalente Peptid-Bindung von Heparin an die freiliegenden und reaktionsfähigen Aminogruppen der Substratoberfläche durch deren Beaufschlagung mit einer wäßrigen Heparin-Lösung.

DE 195 33 682 A 1

Beschreibung

Verfahren zum Anlagern und Immobilisieren von Heparin auf anorganischen Substratoberflächen von kardiovaskulären Implantaten.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Anlagern und Immobilisieren von Heparin auf anorganischen Substratoberflächen von kardiovaskulären Implantaten, wie Herzklappen-Implantaten oder alloplastischen Gefäßwandstützen, die im Fachjargon üblicherweise als "Stents" bezeichnet werden.

Zum Hintergrund der Erfindung ist auszuführen, daß bei der Einpflanzung von kardiovaskulären Implantaten generell das Problem einer akuten Thrombenbildung an der Oberfläche dieser Implantate besteht, da das damit in Kontakt kommende Blut zu Koagulation neigt. Um nun die Gefahr einer akuten Thrombenbildung zu reduzieren, ist es üblich, dem Patienten Antikoagulantien, z. B. Heparin-Präparate in hohen Dosierungen etwa durch Einspritzen in den Blutkreislauf zu verabreichen. Diese Art von Therapie ist jedoch mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden und daher grundsätzlich problematisch.

Ein Ansatz zur Lösung dieser Problematik besteht darin, gerinnungshemmende Medikamente auf der Oberfläche der Implantate chemisch zu binden. Damit wird das z. B. Heparin-Präparat, das auf katalytische Weise eine Koagulation des Blutes verhindert oder zumindest reduziert, nur dort eingesetzt, wo diese Antikoagulationseigenschaften benötigt werden, nämlich im Kontaktbereich des Implantates mit dem Blut.

Es sind nun technische Verfahren zur Belegung organischer Materialien mit Antikoagulation bekannt (siehe beispielsweise B. Seifert et al "Heparinisierte Polylaktide als bioresorbierbare hämokompatible Biomaterialien" in Biomedizinische Technik 1994; 39: S. 103 bis 104). Speziell im Zusammenhang mit Brustkorb-Drainagekathetern aus Polyvinylchlorid ist es bekannt, an das PVC-Material einen photoaktiven Polyacrylamid-Heparin-(Photo-PA/HEP-)Komplex zu binden. Diese Photo-PA/HEP-Beschichtung führt zu einem Katheter mit einer benetzbaren Oberfläche und verbesserten Blutkontakteigenschaften. Spuren von Heparin werden dabei freigesetzt und letzteres gleichzeitig kovalent an die Oberfläche des Katheters gebunden. Bei einem derartig ausgerüsteten Brustkorb-Drainage-Katheter ist die Blut-Klumpen- und Thrombosebildung in dem Bereich minimiert, in dem der Katheter mit dem sich im Brustraum ansammelnden Blut in Kontakt steht. Die vorstehenden Erkenntnisse ergeben sich aus dem Fachbeitrag zum "Surfaces in Biomaterials Symposium" von P. Gingras et al "Surface Modification of Poly (Vinyl Chloride) Chest Drainage Catheters with Anticoagulants for passive Drug Release".

Da nun die eingangs genannten kardiovaskulären Implantate aus anorganischen Materialien, wie z. B. Tantal, einer Titanlegierung, medizinischem Stahl oder pyrolytischem Kohlenstoff bestehen bzw. eine anorganische Beschichtung beispielsweise aus amorphem Siliziumkarbid aufweisen, besteht das Problem ein entsprechendes Verfahren zu finden, um Heparin-Präparate auf den genannten anorganischen Werkstoffen zu binden, damit kardiovaskuläre Implantate antikoagulative Eigenschaften aufweisen können.

Die Lösung dieses Problems ist im Anspruch 1 angegeben. Das demgemäß vorgeschlagene Verfahren weist folgendes Verfahrensschritte auf:

- Aktivierung der anorganischen Substratoberfläche durch Anätzen,
- Anlagern einer photoaktiven Benzophenonverbindung unter UV-Bestrahlung als Spacer mit einer Aminoschutzgruppe auf der aktivierten Substratoberfläche,
- Abspaltung der Aminoschutzgruppe mit einer wasserfreien Piperidinlösung, und
- kovalente Peptid-Bindung von Heparin an die freiliegenden und reaktionsfähigen Aminogruppen der Substratoberfläche durch deren Beaufschlagung mit einer wäßrigen Heparin-Lösung.

Auf diese Weise kann ein kardiovaskuläres Implantat mit einer anorganischen Oberfläche hergestellt werden, an der biologisch aktives Heparin mit einer Oberflächenkonzentration von typischerweise 50 mlU/cm² angelagert ist. Aufgrund der kovalenten Peptid-Bindung des Heparins bleibt dessen Aktivität in vitro über Tage und Wochen unverändert. Die Heparin-Aktivität hemmt in positiver Weise die Blutgerinnung an den kardiovaskulären Implantaten, was durch um den Faktor 3,5 bis 4 gegenüber unbehandelten Proben verlängerte Reaktions- und Gerinnselbildungszeiten bei der Thrombelastographie verifiziert werden kann.

Die Ansprüche 2 bis 8 kennzeichnen vorteilhafte Weiterbildungen des erfindungsgemäßen Verfahrens. So kann das Heparin einerseits auf einer aktivierten Substratoberfläche auf Metall- oder Kohlenstoff-Basis direkt, andererseits aber auch auf der aktivierten Substratoberfläche einer amorphen Siliziumkarbid-Beschichtung des Implantats deponiert werden. Derartige amorphe Siliziumkarbid-Beschichtungen haben in jüngster Zeit verstärkte Aufmerksamkeit als physiologisch günstige Beschichtungsart erfahren, deren positive Eigenschaften durch die hier beanspruchte Anlagerung und Immobilisierung von Heparin im Hinblick auf den erfindungsgemäß vorgesehenen Einsatzzweck noch stark verbessert werden können.

Die bevorzugtermaßen vorgenommene Aktivierung der Substratoberfläche durch Anätzen mit Fluorwasserstoffsäure führt insbesondere im Zusammenhang mit einer amorphen Siliziumkarbid-Beschichtung zu einer wirksamen Protonierung der Oberfläche, was die Effektivität des weiteren Anlagerungsmechanismus unterstützt.

Die als photoaktive Benzophenon-Verbindung bevorzugt verwendete Fmoc-p-Bz-Phe-OH-Lösung in N,N'-Dimethylformamid (DMF) beruht auf einem handelsüblichen Produkt Fmoc-p-Bz-Phe-OH, was den Herstellungsvorgang naturgemäß vereinfacht und rationeller gestaltet.

Die Ansprüche 6 bis 8 beziehen sich auf bevorzugte Verfahrensparameter im Zusammenhang mit der verwendeten wäßrigen Heparin-Lösung. Nähere Informationen darüber sind der Beschreibung des Ausführungsbeispiels entnehmbar.

Die Ansprüche 9 und 10 beziehen sich auf ein kardiovaskuläres Implantat, das mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt ist, so daß Heparin als gerinnungshemmender Stoff mittels einer kovalenten Peptid-

bindung auf der Substratoberfläche angelagert und immobilisiert ist. Bevorzugtermaßen ist dabei die Substratoberfläche durch eine Beschichtung aus amorphem Siliziumkarbid gebildet.

Weitere Merkmale, Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus dem folgenden

Ausführungsbeispiel

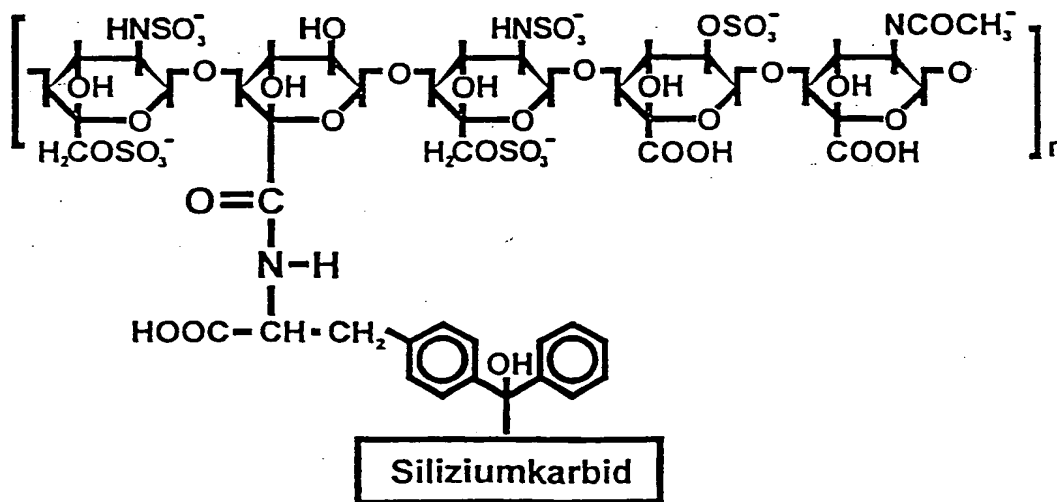
Es ist vorwegzuschicken, daß das erfindungsgemäße Verfahren anhand der Anlagerung und Immobilisierung von Heparin auf einer Siliziumkarbid-(a-SiC:H)-Beschichtung (Probenfläche aus Tantal mit einer Beschichtung aus amorphem Siliziumkarbid, Probengröße $5 \times 10 \times 1 \text{ mm}^3$) beschrieben wird. Die entsprechende Vorgehensweise und die mit der Probe erhaltenen Ergebnisse, wie sie im folgenden noch näher erläutert werden, können jedoch ohne weiteres auf die Anlagerung und Immobilisierung von Heparin auf Stents übertragen werden, die mit einer Siliziumkarbid-Beschichtung versehen sind.

Zur Verfahrensweise ist auszuführen, daß die Siliziumkarbid-Oberfläche zunächst mit 40%-iger Fluorwasserstoffsäure angeätzt wird. Dieses Ätzen führt zur Anlagerung von Protonen an der Oberfläche, was sich durch übliche infrarotspektroskopische Untersuchungen der a-SiC:H-Oberfläche ermitteln läßt.

Danach wird die Probenoberfläche mit Wasser gespült und die Probe in 2 ml einer 20×10^{-6} -molaren Fmoc-p-Bz-Phe-OH-Lösung in N,N'-Dimethylformamid (DMF) inkubiert. Die als photoaktive Spacer-Substanz wirksame Fmoc-p-Bz-Phe-OH-Lösung ist als handelsübliches Produkt "Fmoc-p-Bz-Phe-OH", Produktnummer B 2220 der Firma "Bachem Biochemica GmbH", Heidelberg zu beziehen. Die Reduktion des Benzophenons wird durch die Bestrahlung mit UV-Licht eingeleitet. Nach der UV-Bestrahlung wird die Reaktionslösung abgegossen und die Probe mehrmals mit destilliertem Wasser gespült.

Der nächste Schritt umfaßt die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe mit 25%-iger Piperidinlösung in DMF. An der nun freiliegenden und reaktionsfähigen Anilino-Gruppe erfolgt die Bindung des Heparins. Dazu wird die Probe in 1 ml einer wäßrigen Lösung, bestehend aus 10.000 IU Heparin und 50 mg N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid für einige Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Reaktion wird durch das Abfröhen der Reaktionslösung beendet.

Durch die vorstehend erläuterte Verfahrensweise wird auf der Siliziumkarbid-Oberfläche ein Siliziumkarbid-Spacer-Heparin-Komplex aufgebaut, wie er der folgenden Strukturformel entspricht.



Die Oberflächenkonzentration des biologisch aktiven Heparins auf der Probe kann mittels einschlägiger biochemischer Verfahren zu 50 mIU/cm² bestimmt werden. Derartige Proben wurden weiterhin einem intensiven Spülvorgang in physiologischer Kochsalzlösung unterzogen, um das Verhalten der Heparin-Beschichtung im Blutstrom zu simulieren. Die entsprechenden Versuche ergaben, daß die biologische Aktivität auch nach einer Spülzeit von 14 Tagen nicht abnimmt. Dies bedeutet, daß praktisch eine 100%-ige Immobilisierung des Heparins auf der Siliziumkarbid-Oberfläche stattfindet.

Weiterhin wurde der Einfluß der Heparin-beladenen Beschichtung auf die Blutgerinnung durch den Vergleich der Thrombelastogramme von Proben mit Siliziumkarbid-Beschichtung ohne und mit Heparin-Anlagerung bestimmt. Die Thrombelastographie lieferte Reaktionszeiten und Gerinnungsbildungszeiten, die bei Proben mit Heparin-Anlagerung um den Faktor 3,5 bzw. 4 höher lagen als bei Siliziumkarbid-beschichteten Proben ohne Heparin-Anlagerung. Diese Verzögerung der Blutgerinnung belegt, daß die Siliziumkarbid-Beschichtung mit Heparin-Anlagerung aufgrund ihrer biologischen Aktivität die Blutgerinnung an kardiovaskulären Implantaten hemmt.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Anlagern und Immobilisieren von Heparin auf organischen Substratoberflächen von kardiovaskulären Implantaten, wie Herzklappen-Implantaten oder alloplastischen Gefäßwandstützen, mit folgenden Verfahrensschritt n:

- Aktivierung der anorganischen Substratoberfläche durch Abätzen,
 - Anlagern einer photoaktiven Benzophenonverbindung mit einer Aminoschutzgruppe unter UV-Be-
 - strahlung als Spacer auf der aktivierten Substratoberfläche,
 - Abspaltung der Aminoschutzgruppe mit einer wasserfreien Piperidinlösung, und
 - kovalente Peptid-Bindung von Heparin an die freiliegenden und reaktionsfähigen Aminogruppen
- der Substratoberfläche durch deren Beaufschlagung mit einer wäßrigen Heparin-Lösung.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Heparin auf einer aktivierten Substratoberfläche aus Tantal, Titanlegierung, medizinischem Stahl oder pyrolytischem Kohlenstoff angelagert und immobilisiert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Heparin auf der aktivierten Substratoberfläche einer amorphen Siliziumkarbid-Beschichtung des Implantates angelagert und immobilisiert wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivierung der Substratoberfläche durch Anätzen mit Fluorwasserstoff-Säure, vorzugsweise mit 40%iger Fluorwasserstoff-Säure erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als photoaktive Benzophenonverbindung eine Fmoc-p-Bz-Phe-OH-Lösung in N,N'-Dimethylformamid verwendet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Heparin-Lösung aus Heparin mit N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid in Wasser besteht.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die wäßrige Heparin-Lösung bezogen auf 1 ml Lösungsvolumen 10.000 IU Heparin und 50 mg N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid enthält.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Substratoberfläche mit der Heparin-Lösung für einen Zeitraum von 2 bis 6 Stunden bei Raumtemperatur beaufschlagt wird.

9. Kardiovaskuläres Implantat, wie künstliche Herzklappe oder alloplastische Gefäßwandstütze, hergestellt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 und mit einer anorganischen Substratoberfläche, dadurch gekennzeichnet, daß Heparin mittels einer kovalenten Peptidbindung auf der Substratoberfläche angelagert und immobilisiert ist.

10. Kardiovaskuläres Implantat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Substratoberfläche durch eine Beschichtung aus amorphem Siliziumkarbid gebildet ist.